

QUANTITATIVE ANALYSIS OF CHOLESTEROL IN LIPOPROTEIN

Patent Number: JP2000116400
Publication date: 2000-04-25
Inventor(s): SHINPO HISAO; TADANO TOSHIO
Applicant(s):: TTK KENKYUSHO:KK
Requested Patent: ☐ JP2000116400 (JP00116400)
Application Number: JP19980322772 19981009
Priority Number(s):
IPC Classification: C12Q1/60 ; G01N33/92
EC Classification:
Equivalents:

Abstract

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for individually and quantitatively analyzing cholesterol in each lipoprotein (e.g. respectively in high-density lipoprotein, in low-density one and in very low-density one) without performing a fractionation procedure, which is important for lipid metabolism in the field of clinical diagnosis.

SOLUTION: The method of this invention is to directly and selectively measure cholesterol quantity in each lipoprotein (i.e., chylomicron, HDL, LDL, or VLDL) in a specimen in the presence of a phosphorus compound, a surfactant and a solubilizer for dissolving protein. It is possible to impart selectivity to the reaction of each lipoprotein and enzyme by selecting the kind of the phosphorous compound and by selecting the kinds and concentrations of the surfactant and the solubilizer, and to selectively measure cholesterol in each lipoprotein even in a state that various lipoproteins coexist in a specimen.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-116400

(P2000-116400A)

(43) 公開日 平成12年4月25日 (2000.4.25)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード [*] (参考)
C 1 2 Q 1/60		C 1 2 Q 1/60	2 G 0 4 5
G 0 1 N 33/92		G 0 1 N 33/92	A 4 B 0 6 3

審査請求 未請求 請求項の数10 書面 (全 8 頁)

(21) 出願番号 特願平10-322772

(22) 出願日 平成10年10月9日 (1998.10.9)

(71) 出願人 598156789

有限会社テイ、テイ、ケイ研究所
静岡県沼津市大岡2297-6

(72) 発明者 新保 尚雄

千葉県市川市南八幡1-4-10

(72) 発明者 多々納 俊雄

静岡県沼津市大岡2297-6

Fターム(参考) 2G045 AA13 AA25 BB02 BB29 CA25

DA63 DA64 DA65 DA68 DA69

DB21 FB01

4B063 QA01 QA19 QQ03 QQ76 QQ89

QR03 QR04 QR12 QR41 QR50

QR51 QS28 QX01

(54) 【発明の名称】 リポ蛋白中のコレステロールの定量法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 試料中の各リポ蛋白 (カイロミクロン、HDL、LDL、又はVLDL) 中のコレステロール量を、リン化合物及び界面活性剤、蛋白可溶可溶化剤の存在下、それぞれ直接選択的に測定することを特徴とする定量法の提供。

【解決手段】 リン化合物の種類と界面活性剤、蛋白可溶化剤の種類及び濃度を選ぶことにより各リポ蛋白及び酵素の反応に選択性を持たせた系であり、試料中に各リポ蛋白が共存している状態でも、各リポ蛋白中のコレステロールを選択的に測定出来る系である。本発明は、分画操作をしないで各リポ蛋白、例えば高密度リポ蛋白、低密度リポ蛋白、及び超低密度リポ蛋白中のコレステロールを個別に定量する方法であり、臨床診断の分野において脂質代謝の面で重要なリポ蛋白中のコレステロールの定量法に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 リン化合物及び界面活性剤、蛋白可溶化剤存在下、試料中の各リポ蛋白（カイロミクロン、HDL、LDL、VLDL）中のコレステロール量をそれぞれ選択的に測定することを特徴とする、カイロミクロン、HDL、LDL、又はVLDL中のコレステロールの定量法。

【請求項2】 リン化合物及び界面活性剤、蛋白可溶化剤存在下、試料中のHDL中のコレステロール量を測定することを特徴とするHDL中のコレステロールの定量法。

【請求項3】 リン化合物及び界面活性剤、蛋白可溶化剤存在下、試料中のLDL中のコレステロール量を測定することを特徴とするLDL中のコレステロールの定量法。

【請求項4】 リン化合物及び界面活性剤、蛋白可溶化剤存在下、VLDL中のコレステロール量を測定することを特徴とするVLDL中のコレステロールの定量法。

【請求項5】 リン化合物が無機磷酸、無機磷酸塩、有機磷酸塩、及び有機リン化合物である請求の範囲1～4記載の定量法。

【請求項6】 蛋白可溶化剤がアニオン系界面活性剤、カチオン系界面活性剤及び、又はノニオン系界面活性剤である請求の範囲1～5記載の定量法。

【請求項7】 試料中にコレステロールエステル加水分解酵素及びコレステロール酸化酵素又はコレステロール脱水素酵素を作用させ生成する過酸化水素又は還元型補酵素を定量することからなるコレステロール量を測定する方法において、使用するコレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール酸化酵素又はコレステロール脱水素酵素が化学修飾された、又は未修飾のコレステロールエステラーゼ、化学修飾された又は未修飾のコレステロール酸化酵素、又は化学修飾された若しくは未修飾のコレステロール脱水素酵素である請求の範囲1～6記載の定量法。

【請求項8】 コレステロール量を測定する際に1～3価の金属塩を存在させる請求の範囲1～7記載の定量法。

【請求項9】 コレステロール量を測定する際に糖化合物を存在させる請求の範囲1～8記載の定量法。

【請求項10】 界面活性剤がポリオキシエチレンポリオキシプロピレン共重合化合物、ポリオキシエチレン重合化合物及び、又はポリプロピレン重合化合物である請求の範囲1～9記載の定量法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【技術分野】本発明は、分画操作をしないで各リポ蛋白、例えば高密度リポ蛋白、低密度リポ蛋白、及び超低密度リポ蛋白中のコレステロールを個別に定量する方法であり、臨床診断の分野において脂質代謝の面で重要な

リポ蛋白中のコレステロールの定量法に関する。

【0002】

【背景技術】HDLは抗動脈硬化作用を持つリポ蛋白として注目されるようになり、LDLは抹消細胞にコレステロールを供給する役割を有するとされ、冠動脈硬化症をはじめとする各種動脈硬化症の直接的因子であり、その血中レベルは動脈硬化性疾患の指標となることが知られている。又VLDLも動脈硬化との関連性が注目されている。従来のHDLコレステロールの定量法としては、超遠心法、電気泳動法があり、LDLコレステロールの定量法としては、超遠心法、電気泳動法、換算法などがあり、VLDLコレステロールの定量法としては、超遠心法、電気泳動法がある。超遠心法は基本的定量法として用いられており、分離用超遠心器で比重の差によってHDL、LDL、あるいはVLDLを分離し、そのコレステロール量を測定する。（アドバンスト・イビッド・リサーチ、第6巻、1頁、1968年）。しかしながら、定量性、簡便性、経済性等の面で欠点がある。電気泳動法を用いる場合には、セルロースアセテート膜やアガロースゲルなどを支持体として分離しコレステロールを定量する。しかし、これらの定量法は、多数検体処理、迅速定量および臨床検査の分野で多く使用されている自動分析装置には不向きである。最近、リポ蛋白中のコレステロールを直接測定する方法として、デキストラン硫酸等の凝集剤を用いる方法（特開平6-242110、特許第2、600、065号）、表面活性剤等を用いる方法（特公平6-16720公報、特開昭58-165800公報）、蛋白可溶化剤と糖化合物を用いる方法（PCT/J P96/00665、EP0698791A1）等があるが、いずれの方法もトリグリセライド（TG）、M蛋白の高い試料中のリポ蛋白中のコレステロールの測定を正確に行うことは出来ない。

【0003】

【発明の開示】本発明者等は、リン化合物及び界面活性剤、蛋白可溶化剤を存在させたコレステロール測定試薬の系により、超遠心で分画されたHDL、LDL、VLDL及びカイロミクロン（CM）の各リポ蛋白を用いて測定したところ、リン化合物及び界面活性剤、蛋白可溶化剤の組み合わせによりリポ蛋白の反応性が異なり、その結果HDL中のコレステロール、LDL中のコレステロール、VLDL中のコレステロール及びCM中のコレステロールの反応性が異なることを見だし、本発明を完成した。本発明は、リン化合物及び界面活性剤、蛋白可溶化剤存在下、試料中のHDLコレステロール量、LDLコレステロール量、VLDLコレステロール量、又はCMコレステロール量の定量法に関する。上記測定の際には、更に特異性を上げるために、2価の金属塩及び、又糖磷酸化合物、糖硫酸化合物を併用して使用することも出来る。又、本発明により、リン化合物及び界面活性剤、蛋白可溶化剤を成分とするHDL中のコレステ

ロール、LDL中のコレステロール、VLDL中のコレステロール又はCM中のコレステロールの定量試薬を作ることが出来る。リン化合物としては、無機磷酸化合物、有機リン化合物、有機磷酸化合物及び、又はグルカン磷酸化合物等が用いられる。界面活性剤、蛋白可溶化剤としては、陰イオン系界面活性剤、非イオン系界面活性剤、陽イオン系界面活性剤、両性系（ベタイン型）界面活性剤及び機能付与型界面活性剤を用いることができる。試料中の、HDL中のコレステロール、LDL中のコレステロール、VLDL中のコレステロール及びCM中のコレステロールの何れの部分を測定するかによって界面活性剤、蛋白可溶化剤の種類と濃度、或いは界面活性剤、蛋白可溶化剤の数種類の組み合わせと各々の濃度の組み合わせを選択行わねばならない。例えば試料中のHDL中のコレステロールを測定する場合は非イオン界面活性剤のポリオキシエチレンオキシプロピレンブ

10

ロックポリマー系を選び、試料中のLDL中のコレステロールを測定する場合は非イオン界面活性剤のポリオキシエチレン誘導体と非イオン界面活性剤のポリオキシエチレンポリオキシプロピレン誘導体を選ぶことが出来る。金属塩としては、0.001-50 Mのマグネシウム塩、カルシウム塩、マンガン塩、コバルト塩等が用いられる。本発明は、リン化合物及び界面活性剤、蛋白可溶化剤をリポ蛋白中のコレステロールを測定する試薬中に共存させて直接リポ蛋白中のコレステロールを分別定量する方法で有りコレステロール測定系は酵素的測定系であれば、何れの方法でも可能である。本発明方法は血液、尿などの試料中のリポ蛋白中コレステロールを直接分別測定することが出来る。次に、実施例によって本発明の方法を説明する。

【0004】

【実施例 1】直接HDLコレステロールを定量する方法と超遠心法とを比較した。

本法の試薬組成。

第1試薬

燐酸2ナトリウム
ポリオキシエチレンラウリルアミン
TOOS
トリス緩衝液（PH 6.9）

39 M
4.5 /L
1.3 /L
25 M

第2試薬

コレステロールエステラーゼ
コレステロールオキシダーゼ
4-アミノアンチピリン
パーオキシダーゼ
ポリオキシエチレンモノラウレート
グッド緩衝液（PH 6.9）
ビタミンE燐酸2ナトリウム

1.1 u/ml
7.0 u/ml
2.3 mM
26 u/ml
0.7 g/L
25 mM
0.08 μg/L

本法は、血清試料6μlを、あらかじめ37度で加温した第1試薬300μlに加え37度で5分間加温し、得られた溶液の585nmにおける吸光度を測定した（E1）。次いで、あらかじめ37度で加温した第2試薬100μlを添加攪拌し、5分後に同波長における吸光度を測定した（E2、濃度補正後の値）。HDLコレステ

ロールの量は、HDLコレステロール50mg/dlの標準液を用いて同様の操作を行い、（E2-E1）の値を比較することにより算出した。超遠心法はCDCの方法にしたがって測定した。その結果を表1に示す。

【0005】

表 1

試 料	HDLコレステロール濃度 (mg/dl)	
	本発明の方法	超遠心の方法
1	35.4	37.2
2	43.3	43.1
3	65.1	68.6
4	65.4	66.8
5	70.9	72.1
7	74.7	73.7
8	106.8	107.9

第1表に示したように、本発明の方法の測定結果は、超遠心法の結果と良く一致した。

【0006】

【実施例2】第1試薬及び第2試薬で使用するリン化合物

第1試薬の組成。

ポリオキシエチレンモノラウレート	0.07 g/l
燐酸2ナトリウム	35 mM
TOOS	1.3 mM
β -グルカン燐酸2ナトリウム	2.1 M
硫酸M . 7水和物	3.0 M
アスコルビン酸オキシダーゼ (AOD)	1 /
グッド緩衝液 (pH 6.77)	15 M

第2試薬

β -グルカン燐酸2ナトリウム	2.2 M
燐酸2ナトリウム	26 M
パーオキシダーゼ	20 /
修飾コレステロールエステラーゼ	1 /
修飾コレステロールオキシダーゼ	5.5 /
4-アミノアンチピリン	0.5 /
グッド緩衝液	20 M
ビタミンE燐酸2ナトリウム	0.1 μ /
トコフェロール燐酸塩	1.1 μ /

本法では、それぞれの測定値は、自動分析計で取得した。結果を表2に示す。

【0007】

表 2

試 料	HDLコレステロール濃度 (mg/dl)	
	本発明の方法	超遠心法
1	19.9	18.4
2	23.7	24.1
3	51.8	52.5

【0008】

*とCDC法とを比較した。

【実施例3】直接LDLコレステロールを測定する本法*

本法の試薬組成

第1試薬

燐酸2ナトリウム	27 mM
アスコルビン酸燐酸1カリウム	5 mM
ポリオキシエチレンモノラウレート	5 g/l
TOOS	1.1 mM
トリス緩衝液 (PH 7.0)	25 mM
硫酸マグネシウム	8 mg/ml

第2試薬

コレステロールエステラーゼ	1.1 u/ml
コレステロールオキシダーゼ	5.0 u/ml
パーオキシダーゼ	27.0 u/ml
4-アミノアンチピリン	2.3 mM
燐酸2ナトリウム	21.9 mM
β -グルカン燐酸2ナトリウム	7.0 mM
燐酸2ナトリウム	10 mM
トリス緩衝液 (PH 7.0)	25 mM

本法では、血清試料6 μ lを、37度にあらかじめ加温した第1試薬300 μ lに加え、37度で5分間加温後585nmにおける吸光度を測定した(E1)。次いで、37度であらかじめ加温した第2試薬100 μ lを添加、攪拌し、5分後に同波長における吸光度を測定し

た(E2、濃度補正後の値)。LDLコレステロール量はLDLコレステロール濃度200mg/dlの標準液を用いて、同様の操作をし、その値を比較することにより算出した。その結果を表3に示した。

【0009】

表 3

試 料 名	LDLコレステロールの濃度 (mg/dl)	
	本発明の方法	CDC法
1	58	54
2	81	65
3	69	72
4	87	85
5	93	99
6	98	94
7	126	115
8	133	141
9	153	162
10	171	163

表3から明らかなように、本発明の方法による結果は、
CDC法に良く一致した。

【0010】

【実施例4】主として、第1試薬及び第2試薬に使用する*

* ーリン化合物及び界面活性剤、蛋白可溶化剤の組み合わせを変える以外は、実施例3と同様の操作を行い血清試料5検体について測定値を比較した。

第1試薬の組成

ポリオキシエチレンポリオキシプロピレン	5	g/l
縮合物		
燐酸2ナトリウム	15	mg/l
β-グルカン燐酸塩	2	mM
β-シクロデキストリン燐酸カリウム	1	mM
塩化マグネシウム	3	mM
TOOS	1.1	mM
トリス緩衝液 (PH 7.0)	15	mM

第2試薬

ポリオキシエチレン誘導体	2	g/l
コレステロールエステラーゼ	1.1	u/ml
コレステロールオキシダーゼ	5.1	u/ml
パーオキシダーゼ	28	u/ml
4-アミノアンチピリン	2.5	mM
燐酸2ナトリウム	14	mM
トリス緩衝液 (PH 7.0)	28	mM

結果を表4にしめた。

【0011】

表 4

試 料 名	LDLコレステロール濃度 (mg/ dl)	
	本発明の方法	CDC法
1	41	40
2	56	59
3	95	103
4	111	107
5	119	124
6	137	135

表4に示した様に、本発明の方法による測定結果は、CDC法による測定結果と良く一致した。

【0012】

【実施例5】主として、発色剤、リン化合物及び界面活*

* 性剤、蛋白可溶化剤等の組み合わせを変える以外は、実施例3の本法と同様の測定を行い、血清試料5検体につき、CDCほうとの比較をおこなった。

第1試薬の組成

燐酸1カリウム	20 mM
α-シクロデキストリン燐酸リチウム塩	3 mM
HDAOS	1.1 mM
硫酸マグネシウム	4 mg/ml
グッド緩衝液 (PH 6.9)	25 mM

第2試薬の組成

燐酸1カリウム	10 mM
コレステロールエステラーゼ	5.0 u/ml
コレステロールオキシダーゼ	1.1 u/ml
パーオキシダーゼ	25 u/ml
4-アミノアンチピリン	2.2 mM
ブルロニックL-122	2.2 g/l
エマルゲンL-40	1.5 g/l
ナイミンS-220	1.0 g/l
トコヘロール燐酸	0.2 g/l
グッド緩衝液 (PH 6.9)	25 mM

測定結果を表5に示した。

40 【0013】

表 5

試 料 名	LDLコレステロール濃度 (mg/ml)	
	本発明の方法	CDC法
1	49	52
2	76	79
3	83	82
4	114	117
5	123	128
6	146	137

表5に示すように、本発明の方法による測定結果は、CDC法による測定結果と良く一致した。